



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Evaluación de la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar  
producido en la provincia del Azuay”

Trabajo de Titulación previo a la obtención  
del título de Bioquímica Farmacéutica

**Autores:**

Karen Estefanía Calvache Guerrero

CI. 0706599495

[Karen.gerrero23@hotmail.es](mailto:Karen.gerrero23@hotmail.es)

Karla Yessenia Toro Alvarez

CI. 0706572971

[Karla.toro1016@gmail.com](mailto:Karla.toro1016@gmail.com)

**Director:**

Ing. David Enrique Vanegas Jácome

CI. 0104046057

**Asesor:**

Dra. Silvia Johana Ortiz Ulloa

CI. 0301082897

**Cuenca-Ecuador**

19-febrero-2020



## Resumen:

En la fermentación alcohólica del jugo de caña y su posterior destilación, junto con el etanol se obtienen compuestos de naturaleza volátil llamados congéneres. La NTE INEN: 362, 2014 para aguardiente de caña evalúa la presencia de congéneres entre ellos: metanol, alcoholes superiores y furfural, según esta norma la concentración máxima de estos compuestos es de 10, 150 (total) y 1.5 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto respectivamente.

El objetivo de este trabajo fue optimizar un método analítico por cromatografía de gases con detección de ionización a la llama para la posterior evaluación de la presencia de congéneres en 36 muestras de aguardiente de caña provenientes de los productores registrados en el MIPRO y de otros productores de la provincia del Azuay.

La cuantificación de la concentración de congéneres en las muestras analizadas se llevó a cabo mediante el método de estandarización interna, utilizando el tert-butanol como estándar interno. El orden de elución de los compuestos fue metanol, isopropanol, y furfural con tiempos de retención promedio de  $4.92 \pm 0.01$  min.,  $6.82 \pm 0.01$  min., y  $18.46 \pm 0.004$  min., respectivamente.

En el estudio se encontraron porcentajes bajos de contaminación con congéneres en el aguardiente de caña. En las muestras de productores que no constan en el MIPRO, se encontró una sola muestra con un nivel detectable de metanol (5.5%), mientras que en el 44.4% de las muestras de productores que constan y no en el MIPRO se encontró isopropanol a niveles cuantificables y dos muestras (5.5%) contaminadas con furfural.

**Palabras claves:** Aguardiente de caña de azúcar. Congéneres. Cromatografía de gases. NTE INEN 362, 2014.



### **Abstract:**

In the alcoholic fermentation of cane juice and its subsequent distillation, together with ethanol, compounds of a volatile nature called congeners are obtained. The NTE INEN for cane brandy assesses the presence of methanol, higher alcohols and furfural. The maximum concentration of these compounds is 10, 150 y 1,5 mg/100 cm<sup>3</sup> of absolute alcohol respectively.

The objective of this was to optimize an analytical method by gas chromatography with flame ionization detection for the subsequent evaluation of the presence of congeners in 36 samples of cane schnapps from producers registered in MIPRO and from other producers in the province of Azuay.

The quantification of the concentration of congeners in the analyzed samples was carried out by the internal standardization method using tert-butanol as internal standard. The order of elution of the compounds were methanol, isopropanol, and furfural with average retention times of  $4.92 \pm 0.01$  min.,  $6.82 \pm 0.01$  min., and  $18.46 \pm 0.004$  min, respectively.

In general, low percentages of congenital contamination were found in cane brandy. In the samples from small producers, only one sample was found with a detectable level of methanol (5.5%), while in 44.4% of the producer samples that are included and not in the MIPRO, isopropanol was found at quantifiable levels and two samples (5.5%) were contaminated with furfural.

**Keywords:** Sugar cane brandy. Congeners. Gas chromatography. NTE INEN 362, 2014.



## ÍNDICE DE TRABAJO

<b>I. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Aguardiente .....	13
1.1.1 Producción del aguardiente de caña .....	13
1.2 Productos de la fermentación y destilación del aguardiente de caña .....	15
1.2.1 Etanol .....	15
1.2.2 Congéneres .....	15
1.3 Inocuidad del aguardiente para consumo humano .....	15
1.3.1 Implicaciones toxicológicas .....	16
1.4 Análisis de congéneres en bebidas alcohólicas .....	17
1.4.1 Procesamiento de datos cromatográficos por estandarización interna .....	18
<b>II. METODOLOGÍA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Tipo y diseño del estudio .....	19
2.2 Área de estudio y población .....	19
2.3 Muestreo .....	19
2.4 Análisis cromatográfico .....	20
2.4.1 Materiales, equipos y reactivos .....	20
2.4.2 Tratamiento de la muestra .....	20
2.4.3 Instrumentación .....	23
.....	24
2.4.4 Optimización del método analítico .....	24
2.5 Procesamiento y análisis de datos .....	27
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Optimización del método cromatográfico .....	28
3.1.1 Parámetros de optimización .....	28
3.1.2 Curvas de calibración .....	29
3.2 Análisis de congéneres en aguardiente de caña de azúcar .....	31
3.3 Comparación del contenido de congéneres en aguardiente de caña de azúcar según el grado de tecnificación del proceso .....	33
<b>IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>35</b>
4.1 Conclusiones .....	35
4.2 Recomendaciones .....	36
<b>V. Bibliografía .....</b>	<b>37</b>



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Flujograma del proceso de producción del aguardiente de caña de azúcar.....	13
Gráfico 2. Cantones de la provincia del Azuay donde se realizó la toma de las muestras de aguardiente de caña.....	19
Gráfico 3. Rampas de temperatura del método cromatográfico.....	24
Gráfico 4. Curva de calibración de congéneres construida por el método de estandarización interna.....	30
Gráfico 5. Cromatograma de los estándares. Metanol (1), etanol (2), ter-butanol (3), isopropanol (4) y furfural (5). ....	31
Gráfico 6. Cromatograma de una muestra real de aguardiente de caña proveniente de un productor a mediana escala con una concentración de 30.6 mg/100ml de Isopropanol (1) y 59.2 mg/100ml de furfural (2).....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos del aguardiente de caña (INEN:362, 2014). ....	16
Tabla 2. Revisión de literatura para preparación de la muestra.....	21
Tabla 3. Parámetros analíticos para la optimización del método .....	23
Tabla 4. Preparación de las soluciones a 10 concentraciones a partir de la solución madre de estándares de congéneres de alcohol. ....	25
Tabla 5. Precisión intra-día e inter-día.....	28
Tabla 6. Características del método analítico para el análisis de aguardiente. ....	29
Tabla 7. Áreas, tiempos de retención y concentraciones de los puntos de calibración de estándares de etanol y congéneres.....	29



### **Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional**

Karen Estefanía Calvache Guerrero en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar en la provincia del Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de febrero del 2020.

Karen Estefanía Calvache Guerrero

C. I: 0706599495



**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional**

Karla Yessenia Toro Alvarez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar en la provincia del Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de febrero del 2020.

Karla Yessenia Toro Alvarez

C.I: 0706572971





### **Cláusula de Propiedad Intelectual**

Karen Estefanía Calvache Guerrero, autora de la tesis "Evaluación de la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar en la provincia del Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de febrero del 2020.

Karen Estefanía Calvache Guerrero

C.I: 0706599495





### **Cláusula de Propiedad Intelectual**

Karla Yessenia Toro Alvarez autora de la tesis "Evaluación de la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar producido en la provincia del Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenido expresados en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de febrero del 2020.

Karla Yessenia Toro Alvarez

C.I: 0706572971



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarnos sabiduría y fortaleza para llevar a cabo nuestro trabajo de titulación.

A la Universidad de Cuenca, por la acogida, por sus conocimientos brindados y por facilitarnos la gestión de este proyecto.

A nuestros padres, por el apoyo constante y por dejarnos la mejor herencia que son los estudios.

A la Dra. Johana Ortiz Ulloa, por su guía en el desarrollo de este trabajo, por su paciencia, compromiso, dedicación y conocimientos que fueron esenciales para finalizar nuestra tesis.

Al Ing. David Vanegas Jácome, por su oportuna colaboración y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.



## DEDICATORIA

Quiero dedicar y agradecer a mi madre Floribet, a mis hermanos, Evelyn y Erick, por todo su apoyo, esfuerzo y comprensión durante el desarrollo de mi tesis.

Karen Calvache

Quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios por su oportuna intervención en cada momento de mi vida, por su guía y bendición.

A mis padres, Fanny y Ramiro, quienes, con su esfuerzo y apoyo, se logró cumplir este anhelado sueño, sin ellos me hubiera sido imposible.

A mis hermanos, Jimmy y Nayeli, quienes, con su complicidad y comprensión, me motivaron a seguir trabajando en este proyecto.

A mi compañero de vida, Erick, quien con su positivismo y ayuda me enseñó que soy más grande que cualquier problema.

A mi compañera de tesis, Karen, por su colaboración y esfuerzo en culminar esta gran meta.

Karla Toro



## INTRODUCCIÓN

El aguardiente de caña de azúcar elaborado artesanalmente es una de las bebidas alcohólicas más populares en la provincia del Azuay, debido a su fácil obtención y a su bajo costo económico. Este producto también puede ser empleado como combustible, como materia prima para cosméticos, pinturas, productos de limpieza, entre otros. Debido a ello es muy importante llevar un control de la elaboración y producción del mismo y asegurar su calidad química (Uribe, 2008; Perez & Castellano, 2011).

Durante la fermentación alcohólica del jugo de caña de azúcar y su posterior destilación, a más de etanol se obtiene impurezas volátiles llamadas congéneres. Estas son sustancias químicas residuales que le otorgan a la bebida el sabor y olor característico de la materia prima. Sin embargo, si esta bebida fuese destinada al consumo humano la presencia de congéneres en concentraciones elevadas pueden provocar daños al sistema nervioso, inmune y endócrino (Moya, 2007; INEN:362, 2014). Tal es el caso de múltiples intoxicaciones por aguardiente de caña de azúcar adulterado en los últimos años, registrados por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) de Ecuador (INSPI, 2015).

Los congéneres resultan de una mala destilación del aguardiente de la caña, generalmente estas impurezas volátiles se encuentran en la cabeza y cola del destilado que, al no ser correctamente separadas del cuerpo de la destilación, que contiene en su totalidad etanol, resulta contaminado (Castro, 2013).

Ante la importancia del control del proceso de elaboración de aguardiente de caña, en este estudio se optimizó el método analítico por cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID) y se evaluó la presencia de metanol, furfural e isopropanol, en el aguardiente de productores que constan y no constan en el MIPRO, con el fin de comparar el grado de tecnificación de la producción. Además, con el presente trabajo, se pretende establecer una línea de base que permita conocer la concentración de los congéneres establecidos en la norma INEN: 362, 2014 en este producto, lo que podría permitir mejorar los procesos de producción artesanal de aguardiente de caña.

Los objetivos del presente trabajo de titulación se presentan a continuación:

### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el nivel de contaminación con productos congéneres en el aguardiente de caña de azúcar de producción y venta libre a granel en la provincia del Azuay.



### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Optimizar el método de análisis de congéneres por cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID).

Determinar el contenido de los congéneres (metanol, furfural e isopropanol) en el aguardiente de caña de azúcar.

Comparar el grado de tecnificación de los productores de aguardiente artesanal a mediana y pequeña escala.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Aguardiente

El aguardiente de caña de azúcar, es una bebida alcohólica de alta graduación, obtenida por fermentación alcohólica y destilación del jugo de caña y sus derivados, guardando las características organolépticas de la materia prima. El término aguardiente se deriva del vocablo latino “agua ardens” que hace referencia al alcohol obtenido por fermentación (Ramirez, 2017).

#### 1.1.1 Producción del aguardiente de caña. Gráfico 1.

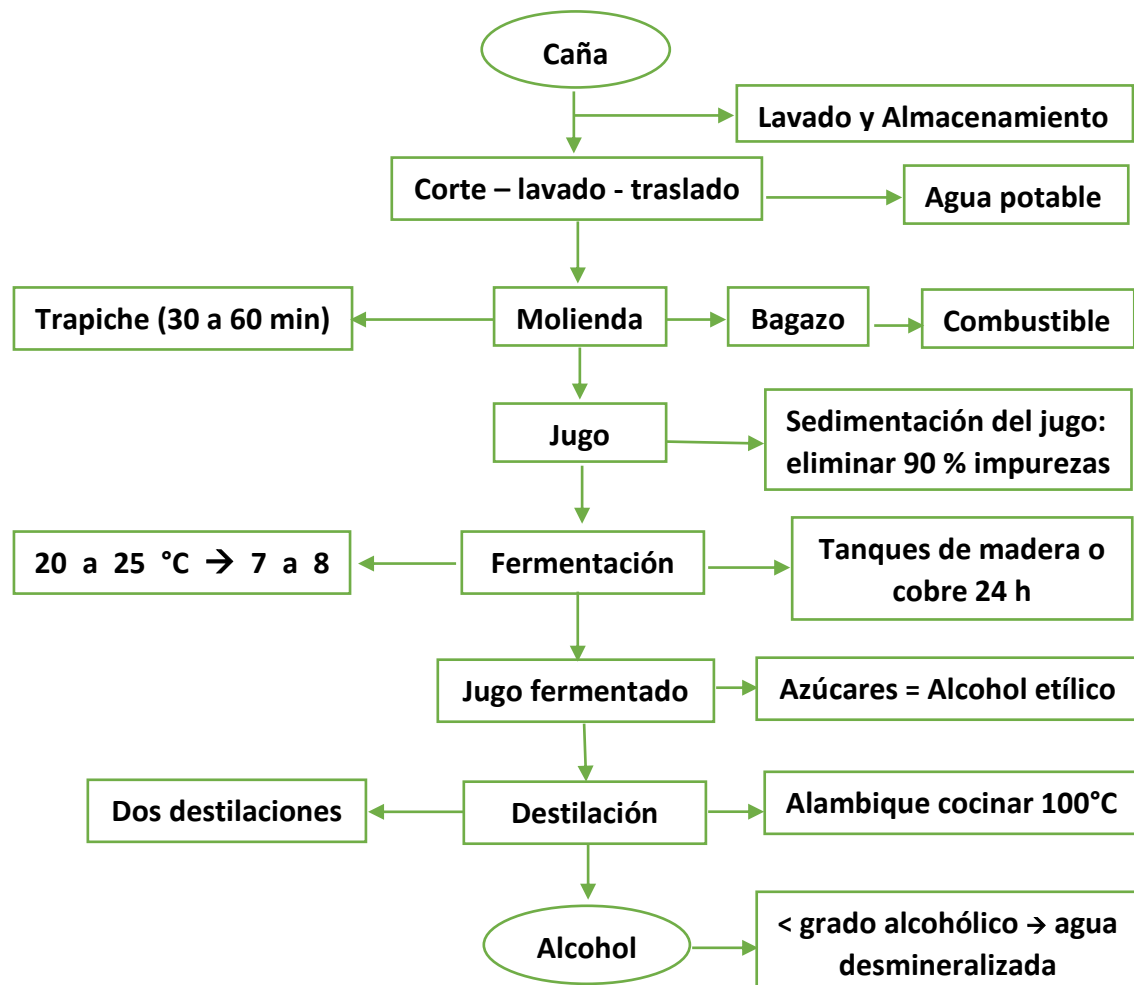


Gráfico 1. Flujograma del proceso de producción del aguardiente de caña de azúcar.

#### ▪ Cosecha, almacenamiento y lavado de la caña de azúcar

La caña de azúcar se cosecha anualmente y de preferencia en verano. Se suele utilizar la incineración de las hojas de la caña con el fin de eliminar el borde filoso de las mismas y ahuyentar posibles plagas. Los tallos y las raíces se dejan intactos para una nueva siembra. Luego la caña cosechada es transportada hacia la molienda y



lavada para eliminar impurezas, posteriormente pasa a ser almacenada hasta tres días (Zegarra, 2002).

#### ▪ **Extracción y sedimentación del jugo de caña**

Para la extracción del jugo de caña se emplea el trapiche, que es, un sistema de tres rodillos de cobre, colocados uno al lado del otro, y separados por unos milímetros para facilitar la molienda. Se introduce la caña de azúcar entre estos rodillos que giran a poca velocidad, extrayendo el jugo de la caña. Se vuelve a repetir este proceso con el fin de obtener la máxima cantidad de jugo. El residuo de la caña de azúcar es llamado “bagazo”, el cual es empleado como carburante para la destilación. Una vez obtenido el jugo de la caña se deja sedimentar con el objetivo de eliminar partículas más gruesas. El líquido extraído se le conoce con el nombre de “guarapo” (Zegarra, 2002).

#### ▪ **Fermentación del jugo de caña**

Para la fermentación se coloca el guarapo en tanques de madera recubiertos con plástico y bien tapados. También se puede emplear recipientes de cobre, pero por su elevado costo, no es generalmente la primera opción. No se deben utilizar tanques de cerámica ni cemento, puesto que los componentes del guarapo son fuertes y tienen a corroer estos materiales y por ende a contaminar el líquido. La fermentación alcohólica del guarapo tiene una duración promedio de 48 horas y se realiza a una temperatura de 20 a 25°C, en este proceso se efectúa la transformación del azúcar que contiene el mosto fermentado, en alcohol etílico (Zegarra, 2002).

#### ▪ **Destilación**

Su finalidad, en este caso, es separar el etanol del jugo de caña fermentado. La destilación es un proceso de separación de los componentes de una mezcla líquida mediante la ebullición selectiva seguida de la condensación. Este proceso se inicia con el calentamiento del mosto fermentado de la caña de azúcar a 75°C aproximadamente en un caldero de cobre, luego comienzan a evaporizarse los compuestos más volátiles del mosto de caña como etanol y congéneres, según sus puntos de ebullición. Los vapores son conducidos hacia un refrigerante para llevar a cabo la condensación de dichos vapores y obtener el alcohol en otro recipiente (Zegarra, 2002). Este primer destilado tiene una graduación alcohólica en torno a los 80°. Si su fin es ser destinado al consumo humano se debería disminuir la graduación alcohólica a 28 - 50° (INEN:362, 2014).





## **1.2 Productos de la fermentación y destilación del aguardiente de caña**

### **1.2.1 Etanol**

Llamado también alcohol etílico, es un líquido incoloro, muy miscible con el agua, con un punto de ebullición de 78°C. Se lo obtiene mediante fermentación de los azúcares de zumos de frutas. Su fórmula condensada es  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . El etanol es el componente principal del aguardiente de caña de azúcar (Álvarez et al., 2008).

### **1.2.2 Congéneres**

Los congéneres, o también llamados impurezas volátiles, son sustancias que se generan durante la fermentación alcohólica y el añejamiento de los mostos de origen vegetal. En este grupo de compuestos están el furfural, alcoholes superiores (isopropanol, propanol, isobutanol, isoamílico, amílico), ácidos orgánicos (metanoico, propanoico, butanoico), ésteres, entre otros (INEN:2014, 2015).

#### **1.2.2.1 Metanol**

Llamado también alcohol metílico. Es un líquido transparente, volátil e inflamable con olor a alcohol puro, presenta un punto de ebullición de 65°C (Jones, 2018). Se encuentra presente en el aguardiente debido a la desesterificación por las pectinas esterases presente en la caña de azúcar. Su fórmula condensada es  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Orriols, 2005).

#### **1.2.2.2 Alcoholes superiores**

Los alcoholes superiores son isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), propanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), isobutanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ), isoamílico ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ) y amílico ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ). Desempeñan un rol significativo, ya que son los que generan en parte el aroma característico del aguardiente de caña obteniéndose de la desaminación de los aminoácidos llevada a cabo por las levaduras (Conde, Rodríguez, Rodríguez, Cabrera, & Pérez).

#### **1.2.2.3 Furfural**

Es un aldehído aromático incoloro con aroma característico a almendras, derivado de subproductos de la agricultura. Su punto de ebullición es de 161,7°C y su fórmula condensada es  $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$  (Torín, 2015).

## **1.3 Inocuidad del aguardiente para consumo humano**

El persistente consumo del aguardiente de caña como bebida artesanal, ha provocado que las autoridades pertinentes reglamenten y regulen el consumo y su producción. Para que se le otorgue la aprobación de funcionamiento de producción se debe pedir la clasificación al Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MPCEIP) con pequeña, mediana industria o artesanal (ARCSA, 2019).

Según, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) en la “Notificación sanitaria simplificada productores nacionales categorizados como microempresas, artesanales UEPS” en el artículo 38 menciona que los fabricantes artesanos que soliciten inscribir bebidas alcohólicas deben presentar una inspección de calidad, llevada a cabo por un laboratorio acreditado, para determinar así, el grado alcohólico y la concentración de congéneres (ARCSA, 2019; Vance, 2013).

Para garantizar que se conserve las condiciones que aprobaron su permiso se, realizan inspecciones de calidad e inocuidad, lo cual esta normado en el artículo 142 de la Ley Orgánica de la Salud (ARCSA, 2019; Vance, 2013). Por otro lado, el Decreto Supremo 005-2013 reglamenta la Ley N° 29632, “Ley para la elaboración y comercialización de bebidas alcohólicas informales adulteradas o no aptas para el consumo humano”, permite normar la producción de bebidas alcohólicas impidiendo su adulteración durante la fabricación y expendio, resguardando así la salud de los consumidores (ARCSA, 2019; FAO, 2013).

Los requisitos establecidos en la NTE INEN 362 indica que el aguardiente de caña debe ser transparente, con aroma y sabor característico a la materia prima, además permite la adición de edulcorantes y aditivos alimentarios siempre y cuando no se altere la naturaleza del producto. Su envasado debe ser en recipientes que no interactúen con el producto y la concentración de los congéneres como se indica en la Tabla 1 (INEN:362, 2014).

*Tabla 1. Requisitos del aguardiente de caña (INEN:362, 2014).*

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	METODO DE ENSAYO
Grado alcohólico a 20°C	% v/v	28	50	NTE INEN 340
Furfural	mg/100 ml	-	1.5	NTE INEN 2014
Alcoholes superiores	mg/100 ml	-	150	NTE INEN 2014
Metanol	mg/100 ml	-	10	NTE INEN 2014
*El volumen de 100 ml corresponde al alcohol absoluto Nota. Los alcoholes superiores comprenden: isopropanol, propanol, isobutanol, isoamílico, amílico.				

### 1.3.1 Implicaciones toxicológicas

El efecto del metanol va a depender de la frecuencia, tiempo de exposición y cantidad que entra en contacto con el organismo, así como también, se debe distinguir si fuese



destinado al consumo humano no intencional o si es inhalado como vapores provenientes de automotores que lo usen como combustible. El metabolismo del metanol se lleva a cabo en el hígado donde primero es oxidado por la enzima alcohol deshidrogenasa a formaldehído, luego es oxidado a ácido fórmico por la enzima aldehído deshidrogenasa, y finalmente se transforma en anhídrido carbónico y agua (Waksman, 2005). La dosis tóxica es de 10 a 30 ml (100 mg/Kg) y la dosis letal va desde 60 a 240 ml (340 mg/Kg). Los efectos adversos por una intoxicación con metanol se evidencian inicialmente con signos y síntomas idénticos al estado de embriaguez, seguido de un periodo latente en el que hay una acumulación de ácido fórmico en el organismo provocando acidosis metabólica. Además, hay dolor abdominal, náuseas, perturbaciones visuales que pueden llevar a ceguera, daño al sistema nervioso central e inclusive la muerte (Kruce, 2012).

EL furfural es oxidado en el hígado por el aldehído deshidrogenasa. Sus efectos tóxicos se evidencian mediante irritación del tracto respiratorio, piel, ojos, además, se altera la función hepática. La dosis tóxica es de es de 65 mg/kg. (Albiano & Villamil, 2015).

El efecto toxicológico que producen los alcoholes superiores es moderado debido a que se encuentran en cantidades pequeñas. Si es ingerido provoca cefalea, náuseas, vómito, dolor del epigastrio y baja de la tensión arterial por otro lado, si se inhala puede ocasionar irritación en la nariz, garganta y ojos. La dosis letal de isopropanol es de 250 ml (8600 mg/kg). (Albiano & Villamil, 2015).

#### **1.4 Análisis de congéneres en bebidas alcohólicas**

La NTE INEN: 2014, 2015 describe a la cromatografía de gases como el método para determinar el contenido de productos congéneres en las bebidas alcohólicas (INEN:2014, 2015). El sistema de cromatografía de gases consta de gas portador, puerto de inyección, horno del inyector, horno que contiene la columna, detector y un software computarizado (Olguín & Rodriguez, 2004). Esta técnica analítica se basa en que, tras inyectar una pequeña cantidad de muestra, esta se volatiliza y se separa en fase gaseosa dentro de la columna cromatográfica calefaccionada a todos los componentes de la muestra, los cuales luego son identificados, purificados y cuantificados (INEN:2014, 2015; Ortiz, 2015).

La cromatografía de gases, por lo general está limitada a la separación de los analitos con peso molecular menos de 1000 DA, con una temperatura máxima de 400°C. Además, esta técnica analítica confiere una alta sensibilidad para analizar una mezcla



volátil. Los límites de utilización del equipo están regidos por la estabilidad térmica de la muestra a separar (Olguín & Rodriguez, 2004).

En particular, el método por cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (CG-FID) es el más empleado por su alta sensibilidad ( $\sim 10^{-13}$  g/s), un gran intervalo de respuesta lineal ( $\sim 10^7$ ) y genera un bajo ruido. El FID indica el número de átomos de carbono que ingresa en el detector por unidad de tiempo, por lo tanto, es más un detector sensible a la masa que a la concentración (Rodda et al., 2013)

En este detector, los compuestos orgánicos se descomponen a una llama de aire/hidrógeno, produciendo iones y electrones los cuales pueden conducir la electricidad a través de la llama, luego se monitorizan las cargas que provienen de la corriente permitiendo la detección. Esta corriente resultante se mide en un picoamperímetro (Kim et al., 2017)

#### **1.4.1 Procesamiento de datos cromatográficos por estandarización interna**

El método de estandarización interna consiste en la utilización de un estándar interno en el proceso analítico que permite compensar posibles errores de manipulación e inyección de la muestra. El estándar interno no debe estar presente en la muestra original, debe tener un alto grado de pureza, además de ser químicamente similar al compuesto problema, y tener una buena resolución con respecto a otros picos de la muestra. La adición del estándar interno se debe realizar en cantidades exactamente medibles tanto en la muestra como en las soluciones patrón. Este método de cuantificación presenta las ventajas de ser independiente del volumen de inyección y de errores por dilución una vez agregado, y además de variaciones en el flujo o condiciones de corrida (Barquero, 2006; Rodda et al., 2013).

## II. METODOLOGÍA

### 2.1 Tipo y diseño del estudio

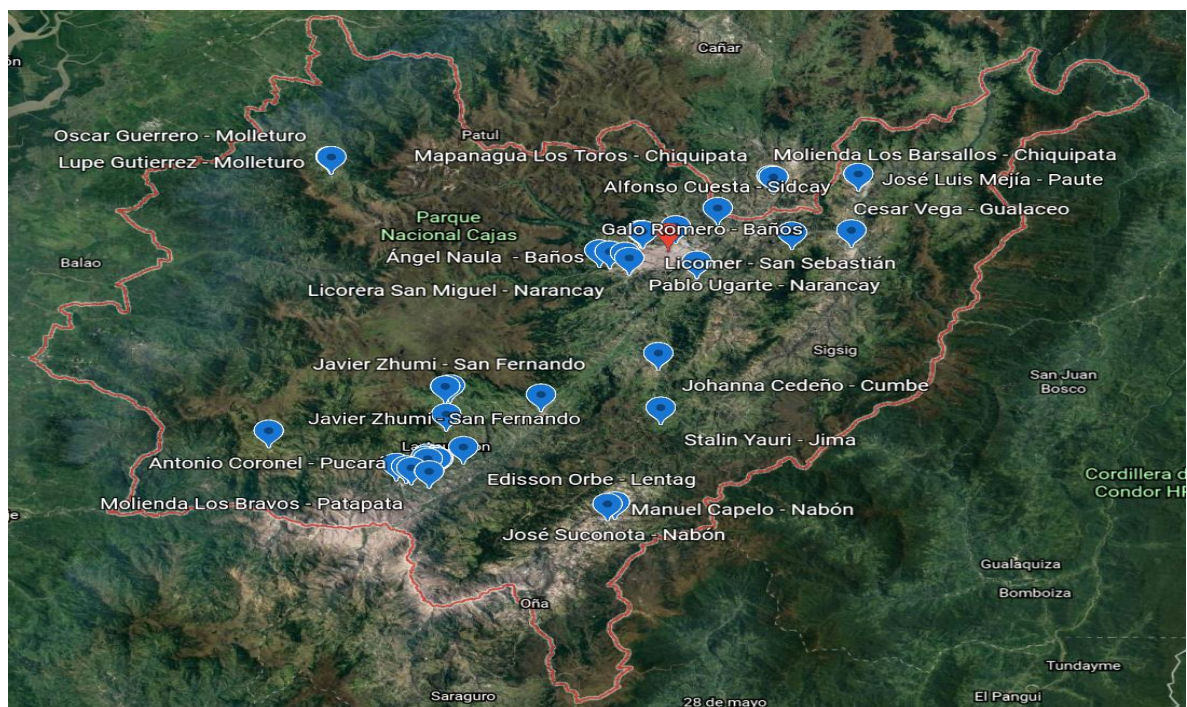
Estudio de tipo analítico, descriptivo de corte transversal.

### 2.2 Área de estudio y población

Productores de aguardiente de caña de la Provincia del Azuay.

### 2.3 Muestreo

Para los productores que constan en la lista del MIPRO, la evaluación se llevó a cabo a toda la población registrada en el Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MIPRO). Del listado proporcionado por la mencionada institución, el cual contenía 30 productores, solo fue posible ubicar a 18 de los mismos. Se realizó un muestreo no probabilístico secuencial para los productores que no constan en la lista del MIPRO, los cuales fueron escogidos con el criterio de que su producción se realice dentro del área de estudio ( $n=18$ ) (Gráfico 2) (Anexo 1).



*Gráfico 2. Cantones de la provincia del Azuay donde se realizó la toma de las muestras.*

La recolección de las muestras de aguardiente de caña se realizó en un solo periodo y por duplicado (14 al 28 de diciembre del 2019), las cuales se recolectaron en envases de plástico de diferente capacidad (200 a 1000 ml), debido a que esta es la manera de expendio de este producto al consumidor.



## **2.4 Análisis cromatográfico**

### **2.4.1 Materiales, equipos y reactivos**

- a) Materiales. –Balones de aforo de 25 y 50 ml, pipetas automáticas de 5-50  $\mu$ l y 100-1000  $\mu$ l, tubos de ensayo con tapa rosca, Microjeringa (Agilent, Alemania), jeringuillas de 3 ml, filtros de membrana PVDF de 13 mm x 0,45  $\mu$ m.
- b) Equipos. –Homogeneizador vortex (Biobase, China), generador de Hidrógeno (Parker, Alemania), cromatógrafo de gases con detector FID, modelo 6890n (Agilent Technologies, Alemania).
- c) Reactivos. –Metanol  $\geq 99.9\%$ , etanol  $\geq 99.9\%$ , Isopropanol  $\geq 99.9\%$ , furfural  $\geq 99.9\%$  fueron comprados en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Ter-butanol  $\geq 99.5\%$  fue comprado en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Agua purificada tipo 1. Gases ultra puros (nitrógeno y aire sintético) (Linde, Alemania).

### **2.4.2 Tratamiento de la muestra**

Para definir la preparación de las muestras analíticas de aguardiente se realizó una revisión bibliográfica de estudios previos, lo que se resume en la tabla 2.





Tabla 2. Revisión de literatura para preparación de la muestra.

Referencia	Nombre del Analito	Preparación de la muestra	Temperatura del inyector	Volumen de inyección	Rampa de temperatura	Temperatura del detector
Kostik V., Mememtil S., Bauer B., 2013.	Metanol, 2-propanol	Las muestras se filtraron por un filtro con un diámetro de poro de 0.45 $\mu\text{m}$ , seguido de la inyección de solución estándar.	250 °C	1 $\mu\text{l}$	60 °C por 5 min. 60-200 °C a 10 °C/min 200 °C por 10 min.	280 °C
Rusu, Socaciu, Parv & Vodnar, 2011.	Metanol	Las muestras fueron inyectadas 1 $\mu\text{l}$ dos veces c/u directamente sin tratamiento.	240 °C	1 $\mu\text{l}$	35 – 85 °C por 5 min a 12 °C/min. 58 – 85 °C a 3 °C/min 155 °C por 3 min a 30 °C/min 230°C por 5 min a 200°C/min.	250 °C
Hernández et al., 2015.	Metanol, furfural	Aplicación de 2 métodos para lograr separar los 19 congéneres, los métodos se aplican repetidamente a múltiples inyecciones de una muestra homogénea y la precisión intermedia, cada muestra y estándar se midió cinco veces.	150 °C	1 $\mu\text{l}$	Método 1: 35 °C por 5 min a 3 °C/min 100 °C por 5 min a 5 °C/min 120 °C por 5 min Método 2: 35 °C por 6 min a 3 °C/min 150 °C por 3 min.	200 °C
Wang & Lee, 2002.	Etanol	Inyección directa, se mezcla 1 ml de muestra más 5 ml de solución estándar.	225 °C	0,1 $\mu\text{l}$	45 °C por 2 min 45-245 °C por 1 min a	285 °C
Anjos, Caldeira, Catarina & Mota, 2011.	Metanol, 2-propen-1-ol	Se preparó una mezcla de 9 ml de cada muestra con 1 ml de solución estándar interno.	200 °C	1 $\mu\text{l}$	35 °C por 8 min 35-200 °C a 10 °C/min 200 °C por 9 min	200 °C





Schlatter, 2013.	Metanol, etanol	Se diluyó 50 ml de muestra con 300 ml de agua estéril, 40 ml de tungsteno de sodio al 10 % y 20 ml de ácido sulfúrico al 1 %. Se centrifuga e inyecta 1 ml del sobrenadante.	220 °C	1 µl	40 °C por 2 min. 40-200 °C a 5 °C/min 200 °C por 10 min.	220 °C
Kim, H., et al., 2017.	Metanol, 2-propanol, tert-butanol.	A cada muestra se añadió 10 µL de IS para llegar a un volumen final de 5 ml.	200 °C	1 µl	40 °C por 10 min. 40-90 °C a 5 °C/min 90-120 °C a 2 °C/min 120-240 °C a 10 °C/min 240 °C por 10 min.	250 °C

Finalmente se optó por preparar las muestras siguiendo la metodología de dos fuentes bibliográficas (Kim, H., et al., 2017; Hernández et al., 2015), cabe recalcar que las condiciones indicadas en estas bibliografías fueron las que mejores se acoplaron tanto a los analitos analizados y a la columna cromatográfica empleada en este trabajo de titulación. A partir de muestras de aguardiente de caña homogenizadas, se tomó 1 ml de muestra y se diluyó 25 veces en un balón de aforo con agua tipo I. De esta solución se tomaron 5 ml que fueron colocados en tubos tapa rosca conjuntamente con 20  $\mu$ l de la solución de estándar interno (tert-butanol) con una concentración de 156.2 mg/100 ml. Luego de homogenizar la solución se filtró empleando filtros de membrana PVDF de 13 mm diámetro x 0.45  $\mu$ m de poro de membrana. Se inyectó en el CG-FID 1  $\mu$ l de solución filtrada.

#### 2.4.3 Instrumentación

Para los análisis se utilizó un cromatógrafo de gases de marca Agilent Technologies 6890n, con detector de ionización a la llama (FID) e inyector manual Split/Splitless. Se empleó una columna cromatográfica ZB-624 (60 m x 0.32 mm x 1.80  $\mu$ m) de cianopropifenilo-dimetilpolisiloxano. El gas portador fue el nitrógeno. Las condiciones en las que se programaron el cromatógrafo de gases se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. *Parámetros analíticos para la optimización del método*

<b>Inyección</b>	Temperatura	175 °C
	Volumen	1 $\mu$ l
	Modo	Splitless
<b>Columna</b>	Características	Phenomenex ZB-624 (60 mm x 0.32 mm x 1.80 $\mu$ m) de cianopropifenilo-dimetilpolisiloxano
	Gas	Nitrógeno
	Flujo constante	2 ml/min
<b>Programa de temperatura del horno</b>	58 °C por 4 min. 58-100 °C a 5 °C/min. 100-160 °C a 10 °C/min. 160 °C por 3 min. El análisis completo duro 21.4 min (Gráfico 3).	
<b>Detector</b>	Temperatura	200 °C
	Flujo de hidrógeno	30 ml/min.
	Flujo de aire sintético	300 ml/min.

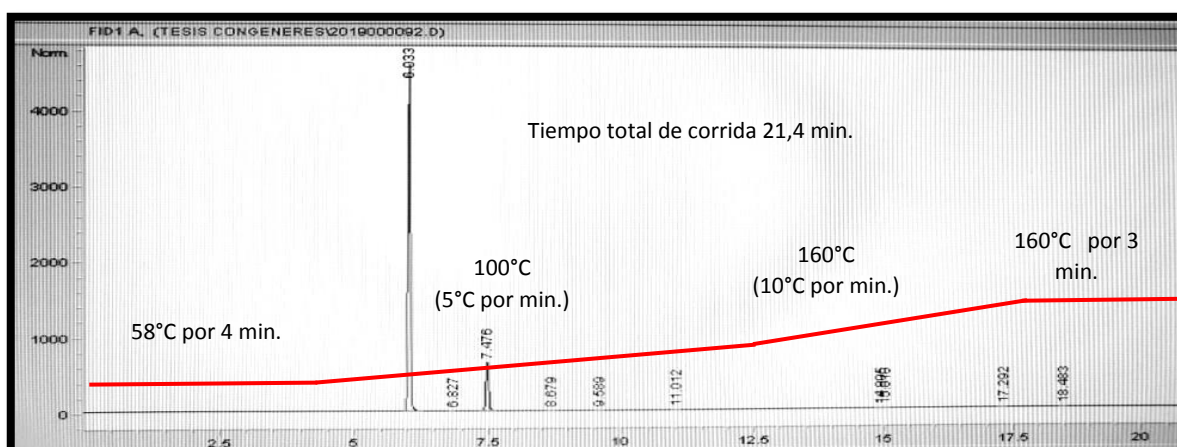


Gráfico 3. Rampas de temperatura del método cromatográfico.

#### 2.4.4 Optimización del método analítico

La optimización del método se llevó a cabo siguiendo la estrategia entre “inhouse” que evalúa los parámetros mínimos y necesarios de calidad y la aplicabilidad de un método analítico. Se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad y rango dinámico lineal, precisión inter-día e intra-día, límites de detección, límites de cuantificación y especificidad (Traverniers et al., 2004).

Los experimentos se realizaron con una mezcla de estándares de alta pureza de metanol, etanol, isopropanol, furfural, ter-butanol. Este último fue utilizado como estándar interno (IS).

##### 2.4.4.1 Linealidad y rango dinámico lineal

La linealidad es la relación lineal entre dos magnitudes (concentración vs respuesta del equipo). La linealidad se evaluó mediante el análisis de regresión lineal con su respectiva ecuación de la curva de calibración ( $y=mx+b$ ), donde  $y$  hace relación del área,  $x$  representa la concentración,  $m$  es la pendiente y  $b$  corresponde al intercepto (Sánchez, 2012).

Para optimizar el método se preparó una solución madre con estándares de metanol, etanol, isopropanol y furfural, en concentraciones basadas en los límites máximos permitidos en la NTE INEN 362. A partir de ésta, se prepararon disoluciones a 10 concentraciones, siendo el nivel 1 al de mayor concentración y el nivel 10 a la menor concentración. A cada una de ellas se le adicionó 20 µl de tert-butanol (IS), llegando a un volumen final para cada nivel de 1000 µl (Tabla 4). Cabe mencionar que se incluyó al etanol en la optimización para diferenciar los tiempos de retención del solvente matriz de los congéneres. Las soluciones de estándares fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases FID por duplicado.



*Tabla 4. Preparación de las soluciones a 10 concentraciones a partir de la solución madre de estándares de congéneres de alcohol.*

Nivel	Isopropanol (mg/L)	Furfural (mg/L)	Metanol & etanol (mg/L)	Factor de dilución	Stock (µl)	Agua HPLC (µl)	IS: ter-butanol (µl)	Volumen final (µl)
1	1500	375	600	1.33	750	230	20	1000
2	100	250	400	2.00	500	480	20	1000
3	500	125	200	4.00	250	730	20	1000
4	250	62.5	100	8.00	125	855	20	1000
5	200	50	80	10.00	100	880	20	1000
6	250	37.5	60	13.33	75	905	20	1000
7	100	25	40	20.00	50	930	20	1000
8	50	12.5	20	40.00	25	955	20	1000
9	25	6.25	10	80.00	12.5	967.5	20	1000
10	10	2.5	4	200.00	5	975	20	1000



El rango dinámico lineal corresponde al intervalo de concentración del analito que incluye una mínima concentración detectable y un límite de cuantificación que va desde una mínima concentración medible hasta la pérdida de la linealidad. (Sergio & Páez, 2012)

Las concentraciones de todos los congéneres fueron determinados a través de la interpolación de las curvas de calibración, usando los valores del área y concentración relativos para el estándar interno en la siguiente ecuación:  $Y_r = mX_r + b$ , donde:  $Y_r$  determina el área relativa (estándar/estándar interno),  $X_r$  determina la concentración relativa (estándar/estándar interno),  $m$  corresponde a la pendiente y  $b$  es el intercepto. La linealidad también se evaluó estableciendo el rango dinámico lineal, comprendido entre el límite de cuantificación (LOQ) que va desde la menor concentración medible hasta que se pierda la linealidad, conservando continuamente la sensibilidad. (Traverniers et al., 2004).

#### **2.4.4.2 Precisión inter-día e intra-día**

La capacidad de obtener un mismo resultado aplicando las mismas condiciones en diferentes mediciones se denomina precisión. Los equipos automatizados tienen una mayor precisión ya que existe una reducción de errores manuales. (Traverniers et al., 2004).

La precisión inter e intra día se determinó analizando la solución estándar del nivel 5 por triplicado por tres días consecutivos. El coeficiente de variación (%CV) inter día se calculó como el pooled CV de cada día en base a un análisis de varianza de un factor, mientras que el %CV intra-día se calculó como el promedio de las réplicas de los tres días analizados (Kamala et al., 2015).

#### **2.4.4.3. Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ)**

El LOD es la señal mínima que puede detectarse en una prueba sin ser ocultada por la señal de fondo, además no se puede cuantificar exactamente (Kamala et al., 2015).

Los límites de detección se calcularon usando la fórmula:

$$LOD = (3 * Seb / m) * \text{concentración IS}$$

Dónde: Seb representa el error estándar del intercepto y  $m$  corresponde a la pendiente de la curva de calibración (Kamala et al., 2015).

El LOQ es el límite de concentración mínimo para cuantificar exactamente a un analito (Kamala et al., 2015).

Los límites de cuantificación se calcularon como  $LOD \times 2$  (Kamala et al., 2015).



#### **2.4.4.4 Especificidad**

Para determinar la especificidad se analizaron tres muestras blanco de aguardiente de caña de azúcar, estableciendo que no había la presencia de interferencia de picos ajenos a los analitos en cada una de las ventanas del tiempo de retención. (Ravisankar et al., 2015)

#### **2.5 Procesamiento y análisis de datos**

Los resultados se compararon entre los productores que constan y no constan en la lista del MIPRO. Además, se realizó una estadística descriptiva de los valores obtenidos, los cuales fueron comparados con los límites máximos permitidos de metanol, furfural y alcoholes superiores establecidos en la NTE INEN: 362, 2014 para aguardiente de caña. Se aplicó la t de Student solo para aquellas muestras que presentaron valores cuantificables.

Los datos Cromatográficos (tiempos de retención y áreas) fueron obtenidas con el software Chemstation (Agilent) 2016.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Optimización del método cromatográfico

Con el método analítico optimizado se logró la separación de los analitos (congéneres y etanol como matriz de muestra). El orden de elución de los compuestos fue metanol, etanol, isopropanol, ter-butanol (IS) y furfural con tiempos de retención promedio de  $4.92 \pm 0.01$  min.;  $6.82 \pm 0.01$  min.;  $18.46 \pm 0.00$  min., respectivamente.

Las condiciones cromatográficas del primer análisis se descartaron debido a que no hubo una correcta separación de los congéneres, por lo cual las rampas de temperatura fueron modificadas, aumentando el tiempo de mantenimiento en la segunda y tercera rampa, logrando así una adecuada resolución de los picos. Esta programación de temperatura se realizó en base a diferentes artículos previamente analizados como se visualiza en la tabla 2.

##### 3.1.1 Parámetros de optimización

Se estandarizó un método previa revisión bibliográfica para lograr la cuantificación de etanol y tres congéneres en el aguardiente de caña de azúcar, estos son metanol, isopropanol y furfural. Se estableció la linealidad, LOD y LOQ, tiempos de retención, DE, %CV, la ventana de tiempo de retención (2.5%) y precisión inter e intra día (Tabla 5). Posteriormente se pudo analizar las muestras recolectadas para demostrar la sensibilidad del método (Tabla 6).

*Tabla 5. Precisión intra-día e inter-día*

<b>Analito analizado</b>	<b>CV Intra (%)</b>	<b>CV Inter (%)</b>
Etanol	6.39	14.76
<b>Congénere analizado</b>	<b>CV Intra (%)</b>	<b>CV Inter (%)</b>
Metanol	3.54	18.4
Isopropanol	8.89	17.3
Furfural	3.7	17.5



*Tabla 6. Características del método analítico para el análisis de aguardiente.*

Parámetros Analíticos	Etanol	Metanol	Isopropanol	Furfural	Unidades
Límite de detección	4.04	3.06	14.69	3.99	mg/100 ml
Límite de cuantificación	8.08	6.20	29.38	7.99	mg/100 ml
Rango lineal bajo	4.0 – 60.0	4.0 - 60.0	10.0 -150.0	2.5 - 37.5	mg/L
Linealidad ( $R^2$ )	0.9874	0.9972	0.9942	0.9904	
Rango lineal alto	80.0 – 400.0	80.0 - 400.0	200.0 - 1000.0	50.0 - 250.0	mg/L
Linealidad ( $R^2$ )	0.9942	0.9937	0.9956	0.9909	
Tiempo de Retención	6.00 ± 0.01	4.92 ± 0.01	6.82 ± 0.01	18.46 ± 0.004	minutos
Precisión inter-día		18.4	17.3	17.5	%
Precisión intra-día		3.54	8.88	3.67	%

La optimización del método analítico aplicado inició con la mejora de la técnica en base a una revisión bibliográfica previa. Para establecer los parámetros analíticos y el tratamiento de la muestra se basó en lo establecido por Kim, H., et al., y Hernández et al., en donde se recomienda aplicar un pre- tratamiento a la muestra para minimizar impurezas (Kim, H., et al., 2017; Hernández et al., 2015), incluso otros autores sugieren que no es necesario realizar un tratamiento preliminar de las muestras (Rusu et al., 2011).

### 3.1.2 Curvas de calibración

Las curvas de calibración de estándares, se basó en el método de estandarización interna, para lo cual se prepararon a 10 niveles de concentración. Las áreas, tiempos de retención y concentración de los puntos de calibración se presentan en la tabla 7.

*Tabla 7. Áreas, tiempos de retención y concentraciones de los puntos de calibración de estándares de etanol y congéneres.*

Etanol			Metanol			Isopropanol			Furfural		
Conc (mg/L)	Área	tR (min)	Conc (mg/L)	Área	tR (min)	Conc (mg/L)	Área	tR (min)	Conc (mg/L)	Área	tR (mg/L)
800	7092,34	6,003	800	6176,79	4,907	1500	1471,4	6,815	375	395,824	18,469
400	4213,78	5,991	400	3524,39	4,907	1000	881,279	6,807	250	256,009	18,463
200	2135,32	6,012	200	1827,57	4,934	500	460,392	6,831	125	126,652	18,468
100	1156,19	6,001	100	998,46	4,922	250	264,978	6,823	62,5	65,714	18,466
80	761,4	5,997	80	679,1	4,919	200	167,503	6,819	50	46,805	18,465
60	524,83	6,001	60	457,06	4,928	150	127,25	6,823	37,5	30,079	18,465
40	401,71	6,009	40	341,06	4,934	100	103,549	6,83	25	24,092	18,468
20	217,31	5,997	20	187,83	4,917	50	67,793	6,82	12,5	13,611	18,464
10	99,39	5,99	10	81,13	4,914	25	42,33	6,81	6,25	6,534	18,457
4	43,4	5,984	4	34,82	4,904	10	34,475	6,807	2,5	3,126	18,46

En el gráfico 4 se presentan las curvas de calibración obtenidas. Cabe mencionar que en el último punto de la curva de calibración de todos los estándares se pierde la linealidad, por lo que esos puntos se dejaron por fuera del rango dinámico lineal. Dichos puntos corresponden a las concentraciones de 800, 1500 y 375 mg/L para el metanol, isopropanol y furfural respectivamente.

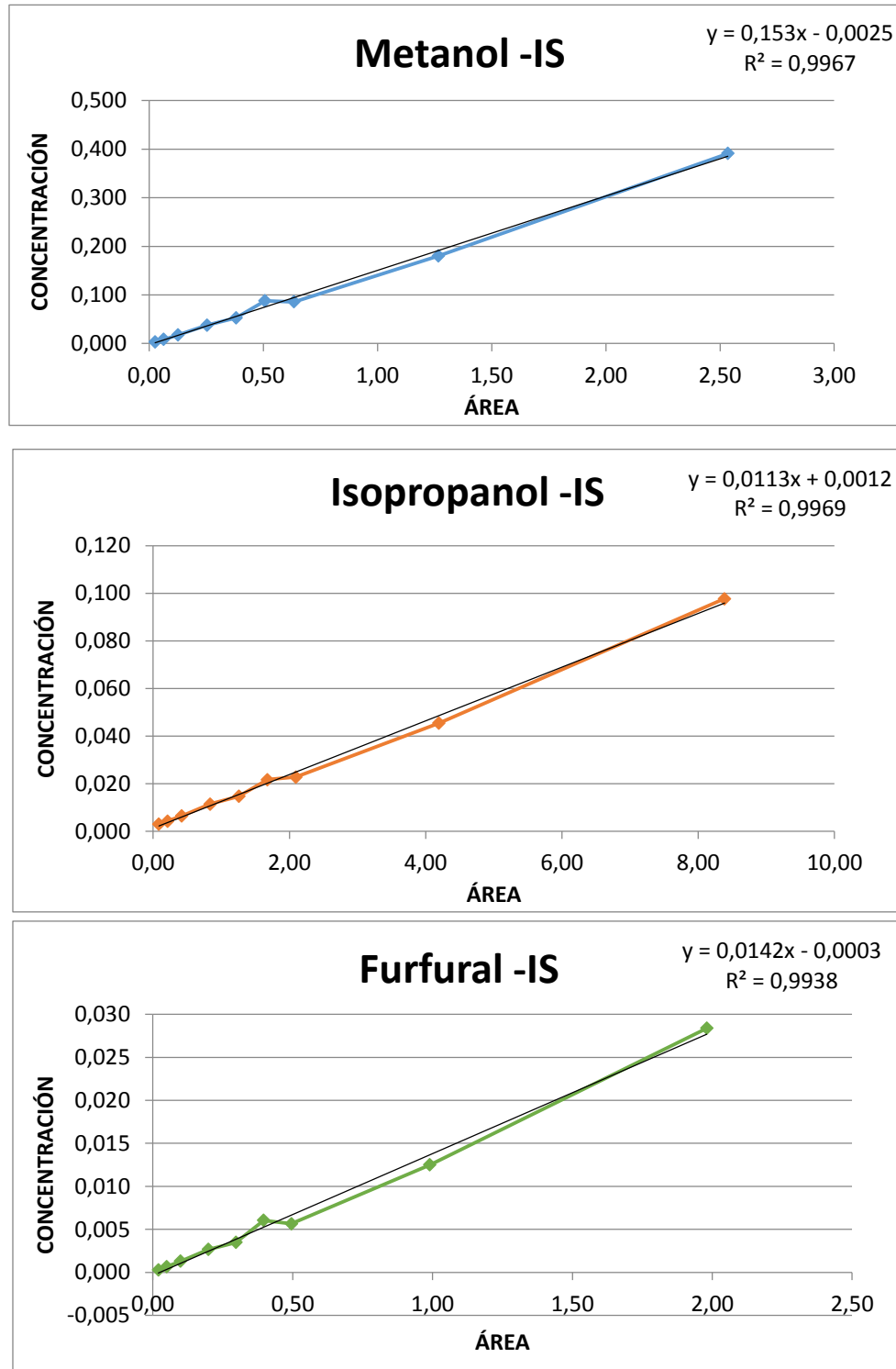


Gráfico 4. Curva de calibración de congéneres construida por el método de estandarización interna.

### 3.2 Análisis de congéneres en aguardiente de caña de azúcar

Las 36 muestras de aguardiente de caña de azúcar analizadas fueron recolectadas de diferentes parroquias y cantones de la provincia del Azuay. La recolección se realizó durante dos semanas (14 al 28 de diciembre del 2019).

Los congéneres encontrados fueron, isopropanol y furfural, tanto en productores que constan y no constan en la lista del MIPRO (Anexo 2). En total, se encontraron 8 muestras positivas con isopropanol en cada grupo de productores, en concentraciones superiores a los 30 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto (valor permitido en la norma NTE INEN: 362, 2014). Con respecto al furfural, se obtuvieron dos muestras positivas, los valores sobrepasaron el límite de 1.5 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto estipulado en la normativa vigente. En cuanto al metanol, este fue observado en solo una de las 36 muestras analizadas y a una concentración dentro de los límites permisibles en la NTE INEN: 362, 2014.

A continuación, se puede observar el cromatograma de los estándares en el nivel 5 (Gráfico 5) y el cromatograma de una muestra real proveniente de un productor que consta en la lista del MIPRO (Gráfico 6).

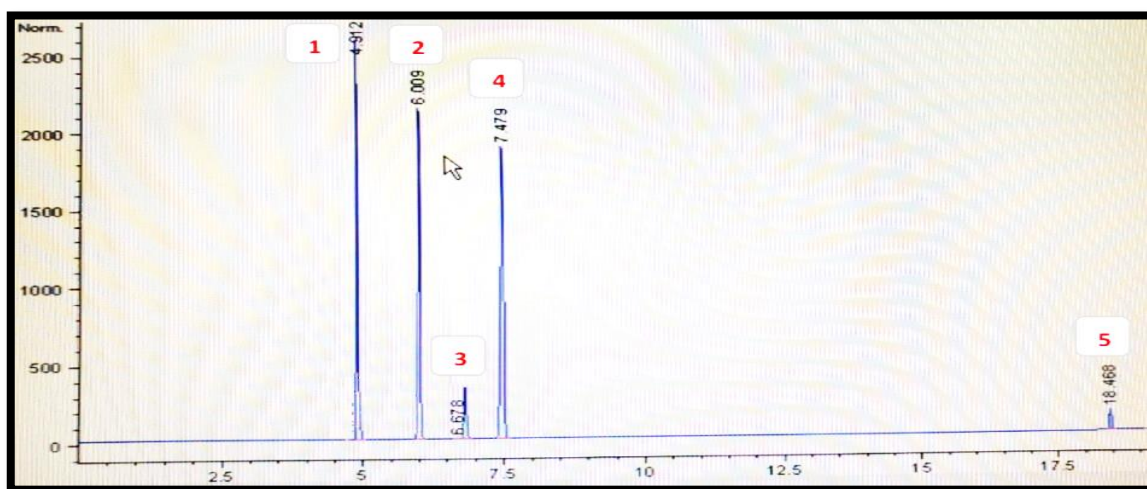
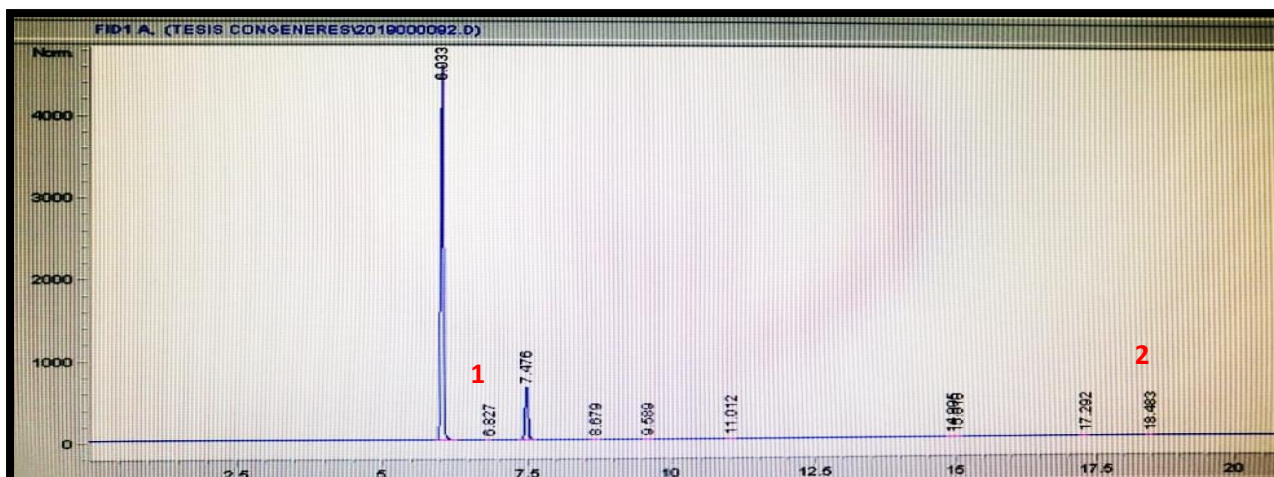


Gráfico 5. Cromatograma de los estándares. Metanol (1), etanol (2), isopropanol (3), ter-butanol (4), y furfural (5).



*Gráfico 6. Cromatograma de una muestra real de aguardiente de caña proveniente de un productor registrado en el MIPRO con una concentración de 30.6 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto correspondiente al isopropanol (1) y 42.1 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto referente al furfural (2).*

Se encontraron muestras provenientes de productores que constan y no constan en la lista del MIPRO con valores detectables (>14.69 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto) de isopropanol en el 44.4% y 50% de los casos, respectivamente, siendo cuantificables (>29.38 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto) en un 44.4% de los casos en ambos tipos de grupo. Para el furfural se obtuvo un 5.5% de muestras cuantificables (>7.99 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto) en ambas listas de los productores.

Los resultados encontrados son similares a un reporte anterior del año 2015 de Cuenca & Collay, en las que, 4 de las 30 muestras analizadas presentaron valores dentro de los rangos establecidos en la normativa para el metanol (Cuenca & Collay, 2015). En contraste el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” reportó en el año de 2011 “la presencia de metanol en muestras de productos incautados en la provincia del Tungurahua” (MSP, 2011). Con respecto al isopropanol, tanto los productores que constan en la lista del MIPRO y los que no, presentaron muestras contaminadas, dichos resultados podemos comparar con un estudio realizado en el año de 2015, en el que, 5 de las 30 muestras de aguardiente de producción artesanal también resultaron con valores superiores a la NTE INEN: 362, 2014 (Cuenca & Collay, 2015). La presencia de los alcoholes superiores según Beda (2001), se debe al tipo de levadura empleada y a la temperatura usada durante la fermentación, ya que cuanto mayor sea la cantidad de azúcar presente en el mosto fermentado, mayor será la producción de los alcoholes superiores, confiriendo a la bebida el aroma y el sabor final. Si esta impureza volátil es muy elevada puede producir un desagradable sabor y olor, adulterando su calidad química (Beda, 2001;



Borroto et al., 2017). En cuanto al furfural obtuvimos valores de 42.18 y 40.0 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto en los productores del MIPRO mientras que, en los productores que no constan en dicha lista, encontramos valores de 39.05 y 36.81 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto, los cuales son superiores a las concentraciones alcanzadas en el estudio del año 2015 que presentaron 2 de las 30 muestras con valores superiores a la normativa NTE INEN: 362, 2014, siendo estos de 1.57 y 1.6 mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto, dichos valores están muy por debajo de los valores encontrados en el trabajo de titulación (Cuenca & Collay, 2015). Según Gonzales et al., 2017, la presencia de furfural en elevadas concentraciones afecta el desarrollo de las levaduras y reduce el rendimiento y productividad del etanol (Gonzales et al., 2017)

### **3.3 Comparación del contenido de congéneres en aguardiente de caña de azúcar según el grado de tecnificación del proceso.**

Con los resultados obtenidos del contenido de congéneres en el aguardiente se realizó una comparación entre los productores que constan en la lista del MIPRO y los que no, haciendo referencia a la concentración de congéneres.

Para esto se aplicó la prueba t de student con las muestras positivas para congéneres, específicamente con los resultados del isopropanol (n=8 productores MIPRO; n=8 productores No MIPRO). La diferencia entre la media de la concentración del isopropanol en productores que no constan en la lista del MIPRO ( $32.12 \pm 0.01$ ) y la media de la concentración en productores del MIPRO ( $30.93 \pm 0.01$ ) no fue estadísticamente significativa ( $P=0.507$ ).

Si bien en este estudio se planteó comparar el grado de tecnificación entre productores de aguardiente de caña que pertenecen tanto a la lista del MIPRO y los que no, en base a la presencia de congéneres en el producto final, este no es el único factor que determine el grado de tecnificación (Molina et al., 2007). Se ha reportado que la variabilidad también va a depender de las particularidades de cada materia prima, es decir, del tipo de caña de azúcar (Molina & et.al, 2007) y de los métodos técnicos empleados para la destilación y descarte de colas y cabezas, que es donde se presentan mayor porcentaje de congéneres (Asclepius, 2016).

Según Hatta (2014), el furfural se encuentra presente mayoritariamente en la cola del destilado, lo que resalta la importancia de separar correctamente la cola del cuerpo del destilado (Hatta, 2014).

Parazzi y Pomar (2007) indican que, mientras mayor sea el añejamiento del aguardiente, menor será la presencia de los alcoholes superiores, disminuyendo su



aroma. Por lo tanto, el grado de añejamiento del aguardiente debería considerarse en estudios posteriores para explicar el alto porcentaje de muestras con isopropanol tanto en muestras procedentes de productores con o sin ningún tipo de control o registro. (Parazzi et al., 2008; Pomar, 2007).

## IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

En este trabajo de titulación se evaluó la presencia de congéneres en el aguardiente de caña de azúcar, los productores que se encuentran registrados en la lista del MIPRO y los que no, en la provincia del Azuay, por el método de cromatografía de gases con detección de ionización a la llama.

Mediante este trabajo se consiguió la optimización del método analítico eficiente con una muy buena resolución de los picos cromatográficos y estableciendo la preparación de la muestra, el rango de linealidad, los límites de detección, los límites de cuantificación y la precisión intra e inter día. La aplicabilidad de este método podría extenderse al análisis de alcoholes en general, lo cual podría usarse en diferentes investigaciones y trabajos de control y monitoreo.

De las muestras provenientes de los productores que no constan en la lista del MIPRO, una de las 18 muestras (5.5%) presentó metanol ( $\bar{X}=3.07$  mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto) y otra muestra con furfural ( $\bar{X}=37.93$  mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto). El congénere más relevante fue el isopropanol que se encontró en el 94.4 % de las muestras, presentándose 44.4% sobre el límite de cuantificación en un promedio de  $\pm 0.001$ . Una situación similar se observó en las muestras provenientes de los productores de la lista del MIPRO. Una de las muestras presentó furfural ( $\bar{X}=41.05$  mg/100 cm<sup>3</sup> de alcohol absoluto) y el 88.8 % presentó isopropanol, siendo cuantificable para el 44.4 % de las muestras.

Finalmente, se evaluó si el grado de contaminación de congéneres era diferente entre los productores de aguardiente que están inscritos en la lista del MIPRO y los que no. Fue posible realizar este análisis solo con los datos de isopropanol y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa (prueba t,  $P=0.507$ ), por lo que, en las muestras analizadas no se encontró evidencia demostrativa para establecer una diferencia entre la procedencia de las muestras y una potencial asociación entre la contaminación del aguardiente con isopropanol y el grado de tecnificación de su proceso de producción. Sin embargo, se requiere de más estudios para establecer este tipo de asociaciones. Con el resto de congéneres no fue posible aplicar la prueba t de student ya que los resultados obtenidos de muestras positivas fueron solo dos.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el 55.5 % de las muestras analizadas tanto de los productores registrados en el MIPRO como los que no





constan, son aptas para el consumo humano. Cabe recalcar que el metanol que es el congénere que más graves intoxicaciones produce e inclusive la muerte, solo fue hallado en una muestra y su concentración dentro de lo permitido en la norma NTE INEN: 362, 2014, sin embargo, la concentración del isopropanol si sobrepasa los valores de lo permitido en la norma antes mencionada, por lo que se debe tener precaución al momento de adquirir y consumir este producto.

#### **4.2 Recomendaciones**

Para poder discernir sobre los puntos críticos en el proceso de elaboración de aguardiente que contribuyan en la formación de congéneres, se recomienda realizar monitoreo de las diferentes etapas de producción del aguardiente de caña de azúcar, principalmente durante la fermentación, controlando la temperatura, el tiempo de fermentación y adición de levaduras. También es imprescindible controlar la destilación, descartando las cabezas y colas del destilado, para obtener un producto de calidad. Además se recomienda se hagan estudios con repeticiones en un lapso de tiempo.



## V. Bibliografía

- Albiano, N., & Villamil, E. (2015). *Toxicología laboral*. Republica de Argentina.
- Alvarez, S., Evelson, P., & Boveris, A. (2008). *Etanol*. Buenos Aires : Universidad de Buenos Aires .
- Anjos, Caldeira, Catarina, & Mota. (2011). *Single-laboratory validation of determination of acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and fusel alcohols in winw spirits, brandies and grape marc spirits using GC-FID*. Ciencia Tec. Vitiy. 26.
- ARCSA. (2019). *Instructivo descriptivo de establecimientos sujetos a vigilancia y control sanitario*. Guayaquil .
- Asclepius, M. (2016). *Manual de destilación urbana: Guía moderna para la elaboración y destilación de ron, brandy, vodka, tequila, calvados, schnaps y destilados neutros basados en mostos azucarados y afrutados*.
- Barquero, M. (2006). *Principios y aplicaciones de la Cromatografía de gases*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Beda, P. (2001). *Caracterización de los alcoholes superiores presentes en las bebidas alcoholicas*.
- Borroto, D., Lorenzo, M., García, R., & Reyes, A. (2017). Aspectos fenerales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcoholicas. *ICIDCA*, 58-65.
- Castro, M. (2013). *Industrialización de tragos a base de aguardiente con limón y maracuya*. Piura-Perú: Universidad de Piura.
- Conde, J., Rodríguez, M., Rodríguez, J., Cabrera, H., & Pérez, J. (s.f.). *Determinación de volátiles mayoritarios en vinos tintos de las islas Canarias*. Islas Canarias: Jornadas técnicas vinícolas Canarias .
- Cuenca, Y., & Collay, L. (2015). *Cuantificación del contenido de metanol en tres bebidas alcoholicas tradicionales producidas, en diferentes localidades en el cantón Echeandía provincia Bolivar*. Guaranda: Universidad Estatal de Bolivar.
- FAO. (2013). *Decreto Supremo N° 005-2013*. Perú: Ministerio de la producción .
- Gonzales, A., Rodriguez, N., & Bustos, G. (2017). *Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar* . México: Universidad Autonoma de Tamaulipas.



- Hatta, B. (2014). *Influencia de la fermentación con orujos en los componentes volátiles del Pisco de uva*. Italia.
- Hernandez, F., Recalde, V., & Erazo, A. (2015). *Determinación de congéneres en el alcohol extraneuro rectificado empleado en la elaboración de bebidas alcohólicas*.
- INEN:2014. (2015). *Bebidas alcohólicas. Determinación de productos congéneres por cromatografía de gases*. Quito: INEN.
- INEN:362. (2014). *Bebidas alcohólicas. Determinación de productos congéneres por cromatografía de gases*. Quito: NTE INEN.
- INSPI. (2015). *Intoxicaciones con metanol en la provincia del Azuay*. Azuay: MSP.
- Jones, B. (01 de febrero de 2018). *Geniolandia*. Obtenido de Geniolandia : <https://www.geniolandia.com/13077647/caracteristicas-del-metano>
- Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., & Meulenaer, B. (2015). Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. *Food Control*, Elsevier.
- Kim, H., Yang, G., Kim, J., Yoon, S., & Shin, B. (2017). *Simultaneous Determination of Volatile Organic Compounds in Commercial Alcoholic Beverages by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*. Journal Of AOAC International.
- Kostik, V., Memeti, S., & Bauer, B. (2013). *Gas-chromatographic analysis of some volatile congeners in different types of strong alcoholic fruit spirits*. Macedonia.
- Kruce, J. (2012). *Methanol and ethylene glycol intoxication*. *Critical Care Clinics*. Elsevier.
- Molina, J., & et.al. (2007). Compuestos volátiles en el Mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 41-50.
- Moya, C. (2007). *Comisión clínica de la delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas: Informe sobre alcohol*. España: Ministerio de Sanidad y Control.
- MSP. (2011). *Boletín epidemiológico N° 7, Ministerio de Salud Pública*. Quito: MSP.
- Olguín, L., & Rodriguez, R. (2004). *Cromatografía de gases*. México.
- Orriols, L. (2005). *La elaboración de aguardiente*. Ourense- Madrid .



- Ortiz, J. (2015). *Apuntes de analisis Instrumental Cromatografía* . Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Parazzi, C., Marquez, C., Correa, J., & Mendes, M. (2008). Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 193-199.
- Perez, M., & Castellano, G. (2011). *Hígado y alcohol*. Madrid-España: Hospinal Universitario 12 de Octubre.
- Pomar, M. (2007). *Envejecimiento de vino tinto de la D.O. Tacoronte-Acentejo: influencia de la madera de roble y de las condiciones de vinificación en la evolución de parámetros físico-químicos de interés enológico y su impacto sensorial*. España: Universidad de la Laguna.
- Ramirez, N. (2017). *www.alambiques.com*. Obtenido de *www.alambiques.com*: <http://alambiques.com/aguardientes.htm>
- Ravisankar, P., Pravallika, D., & Navya, D. (2015). A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation . *IOSR Journal of Pharmacy*, 7-19.
- caanalysis and the source of alcohol: a review. *Forensic Sci Med Pathol*, 194-207.
- Rusu, T., Socaciu, C., Parv, M., & Vodnae, D. (2011). Gas-Chromatographic Analysis of Major Volatile Compounds Found in Traditional Fruit Brandies from Transylvania, Romania. *Not Bot Horti Agrobo*, 109-116.
- Sanchez, M., Aviles, M., & Gonzalez, L. (2012). Desarrollo y validación del método para la determinación de ácido clofíbrico por cromatografía de gases masas. *Ra Ximhai*, 159-164.
- Sergio, M., & Páez, C. (2012). *Documentación de la técnica de Cromatografía de gases en el análisis de hidrocarburos alifáticos en aguas residuales*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Torín, J. P. (13 de marzo de 2015). *Extracción y refinación de azúcar*. Obtenido de <https://extraccionyrefinaciondeazucartorin.blogspot.com/2015/03/furfural.html>
- Traverniers, I., Loose, M., & Bockstaele, E. V. (2004). *Trends in Analytical Chemistry* . Belgium: Elsevier.
- Uribe, J. (2008). *Caña, azúcar y aguardiente de charanda*. Mendoza-Argentina: Universidad de Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.



- Vance, C. (2013). *Reglamento de registro y control sanitario de alimentos: Acuedo Ministerial 2912*. Quito: Lexis.
- Waksman, J. (2005). *Alcoholes tóxicos: Etilenglicol, Metanol, Dieletilenglicol*. E.E.U.U.: Universidad de Colorado .
- Wang, M., Choong, Y., Sun, N., & Lee, M. (2002). *A Rapid Method for Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages Using Capillary Gas Chromatography*. Journal of Food and Drug Analysis, vol 11.
- Zegarra, D. (2002). *La agroindustria de la caña de azúcar en Ayabaca: Diagnóstico y propuesta del desarrollo sectorial*. Piura-Perú: Universidad de Piura.



## ANEXOS

*Anexo 1. Lista de muestreo de aguardiente de caña de azúcar en la provincia del Azuay.*

Número de muestra	Nombre del propietario/ nombre del lugar de producción	Cantón / parroquia	Productores NO MIPRO	Productores MIPRO
1	Molienda Hugo Brito	Yunguilla	x	
2	Molienda Yunguilla	Yunguilla	x	
3	Molienda el Turista	Yunguilla	x	
4	Mapanagua	Yunguilla	x	
5	Molienda el Time	Yunguilla	x	
6	Molienda camino a Sol y agua	Yunguilla	x	
7	Molienda el Portón del sabor	Yunguilla	x	
8	Molienda Arturo	Yunguilla	x	
9	Molienda Ing. Ignacio	Santa Isabel	x	
10	Molienda Los Bravos	Patapata	x	
11	Mapanagua Los Toros	Chiquipata	x	
12	Molienda Los Barsallo	Chiquipata	x	
13	Molienda Girón	Girón	x	
14	Molienda Antigua	Santa Isabel	x	
15	Pablo Ugarte	Narancay	x	
16	Alfonso Cuesta	Sidcay	x	
17	Galo Romero	Baños	x	
18	Carlos Reyes	El Valle	x	
19	Ángel Naula	Baños		x
20	Antonio Coronel	Pucará		x
21	Manuel Capelo	Nabón		x
22	Vega César	Gualaceo		x
23	Bolívar Bernal	Jadán		x
24	Lupe Gutiérrez	Molleturo		x
25	Oscar Guerrero	Molleturo		x
26	Hernán Deleg	San Sebastián		x
27	Licomer	San Sebastián		x
28	Johanna Cedeño	Cumbe		x
29	José Suconota	Nabón		x
30	Eddison Orbe	Lentag		x
31	Javier Zhumi	San Fernando		x
32	Liconacionales	El Vecino		x
33	José Luis Mejía	Paute		x
34	Licorera San Miguel	Narancay		x
35	Stalin Yauri	Jima		x
36	María Zhingri	Pucallpa		x



**Anexo 2.** Resultados de la concentración de congéneres en muestras de aguardiente de caña de azúcar.

Número de muestra	Concentración en mg/100 ml			Productores NO MIPRO	Productores MIPRO
	Metanol	Isopropanol	Furfural		
1	n.d.	29.9	n.d.	x	
1	n.d.	30.5	n.d.	x	
2	3.08	30.9	n.d.	x	
2	3.06	30.1	n.d.	x	
3	n.d.	24.9	n.d.	x	
3	n.d.	22.4	n.d.	x	
4	n.d.	25.1	n.d.	x	
4	n.d.	23.0	n.d.	x	
5	n.d.	32.6	n.d.	x	
5	n.d.	34.9	n.d.	x	
6	n.d.	17.0	n.d.	x	
6	n.d.	17.8	n.d.	x	
7	n.d.	29.5	n.d.	x	
7	n.d.	29.8	n.d.	x	
8	n.d.	22.2	n.d.	x	
8	n.d.	17.1	n.d.	x	
9	n.d.	30.9	n.d.	x	
9	n.d.	32.0	n.d.	x	
10	n.d.	43.2	n.d.	x	
10	n.d.	46.3	n.d.	x	
11	n.d.	29.9	39.05	x	
11	n.d.	30.4	36.81	x	
12	n.d.	16.5	n.d.	x	
12	n.d.	15.4	n.d.	x	
13	n.d.	23.4	n.d.	x	
13	n.d.	18.9	n.d.	x	
14	n.d.	20.3	n.d.	x	
14	n.d.	29.3	n.d.	x	
15	n.d.	29.8	n.d.	x	
15	n.d.	30.2	n.d.	x	
16	n.d.	21.5	n.d.	x	
16	n.d.	25.6	n.d.	x	
17	n.d.	7.2	n.d.	x	
17	n.d.	10.5	n.d.	x	
18	n.d.	28.0	n.d.	x	
18	n.d.	25.5	n.d.	x	
19	n.d.	30.6	42.1		x
19	n.d.	31.2	40.0		x
20	n.d.	25.8	n.d.		x



20	n.d.	16.7	n.d.		x
21	n.d.	28.6	n.d.		x
21	n.d.	23.0	n.d.		x
22	n.d.	9,0	n.d.		x
22	n.d.	11.8	n.d.		x
23	n.d.	23.0	n.d.		x
23	n.d.	23.7	n.d.		x
24	n.d.	20.6	n.d.		x
24	n.d.	17.4	n.d.		x
25	n.d.	19.6	n.d.		x
25	n.d.	21.2	n.d.		x
26	n.d.	9.0	n.d.		x
26	n.d.	10.3	n.d.		x
27	n.d.	34,6	n.d.		x
27	n.d.	32.6	n.d.		x
28	n.d.	14.6	n.d.		x
28	n.d.	18.7	n.d.		x
29	n.d.	31,5	n.d.		x
29	n.d.	29,7	n.d.		x
30	n.d.	29.8	n.d.		x
30	n.d.	31.6	n.d.		x
31	n.d.	23.3	n.d.		x
31	n.d.	22.4	n.d.		x
32	n.d.	30.4	n.d.		x
32	n.d.	30.1	n.d.		x
33	n.d.	30.4	n.d.		x
33	n.d.	31.0	n.d.		x
34	n.d.	30.3	n.d.		x
34	n.d.	31.0	n.d.		x
35	n.d.	21.9	n.d.		x
35	n.d.	29.2	n.d.		x
36	n.d.	29.5	n.d.		x
36	n.d.	30.0	n.d.		x